

Analyse des acides gras conjugués et *trans* après dérivation

O. Berdeaux, P. Juanéda et J.L. Sébédio

INRA, Unité de nutrition lipidique, 17 rue Sully, BV1540, 21034 Dijon Cedex, France

Fatty acid methyl esters can be prepared easily by direct acid transesterification. If conjugated fatty acids are present, soft techniques must be used. In spite of new polar phases and capillary columns, the complete separation of all the fatty acids cannot be obtained by GC. However, the utilisation of silver ion HPLC and TLC helps to resolve some of the isomers. The derivatisation of fatty acids in DMOX, picolinyl and MTA derivatives enable the determination of the double bond position by GC-MS. GC-FTIR achieved the determination of the geometrical configuration.

Les isomères d'acides gras monoinsaturés sont généralement formés à la suite de l'hydrogénation catalytique des huiles alimentaires [1] alors que les acides gras *trans* polyinsaturés (AGPI) apparaissent pendant la désodorisation ou la friture [2,3]. Ceux-ci sont principalement formés à partir de l'acide linoléique (*cis*-9, *cis*-12-18:2) et linoléinique (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15-18:3). Les acides gras conjugués peuvent avoir une origine naturelle et sont ainsi présents dans les produits laitiers et les viandes de ruminants [4]. Ceux-ci peuvent également être formés à la suite d'un traitement technologique, comme par exemple l'hydrogénation partielle [1] ou la friture [5].

Il a été récemment montré que certains isomères d'acides gras polyinsaturés pouvaient également être métabolisés par l'animal [6,7]. Les mélanges d'isomères formés sont généralement complexes et nous décrirons ci-dessous les différentes méthodes utilisées qui permettent leur quantification dans les différents aliments mais aussi l'analyse structurale des métabolites présents dans les échantillons biologiques.

Utilisation de différentes techniques chromatographiques pour l'analyse des esters méthyliques d'acides gras *trans* et conjugués

La dérivation des acides gras en esters méthyliques est la technique la plus utilisée pour l'analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse.

Différentes méthodes sont utilisées pour la dérivation des acides gras à partir d'une matrice lipidique complexe comme les triglycérides ou les phospholipides [8]. Les esters méthyliques sont couramment préparés par transestérification directe des triglycérides ou des phospholipides en présence d'un catalyseur qui est soit acide (HCl, H₂SO₄, BF₃ dans le méthanol) soit basique (méthanolate de sodium ou de potassium). Par contre, la saponification suivie d'une estérifica-

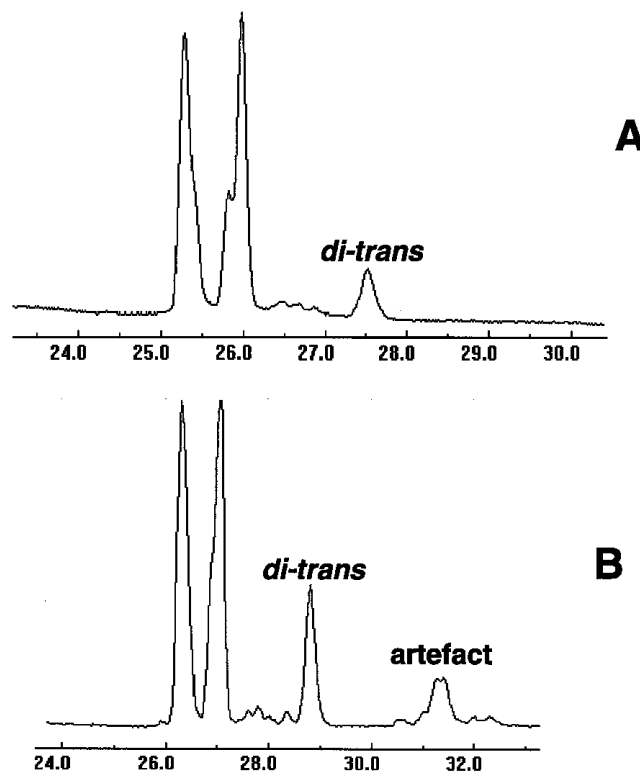


Figure 1. Chromatogramme en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras conjugués du C18:2 sur colonne BPX70. A : méthylation selon Carreau et Dubacq [11], B : méthylation selon Morrison et Smith [14].

tion des acides gras libérés est, de nos jours, une méthode moins utilisée.

Le choix de la méthode de méthylation repose en grande partie sur la présence d'acides gras conjugués dans l'échantillon. En 1972, Koritala et al. [9] ont signalé la présence d'artefacts au cours de la méthylation avec du BF₃-méthanol. Shantha et al. [10], qui ont étudié différentes méthodes de méthylation, ne recommandent pas l'utilisation de catalyseur acide. En effet, la transestérification en présence de catalyseur acide est réalisée à haute température (90 à 100 °C) ce qui entraîne l'isomérisation des doubles liaisons conjuguées, d'où une augmentation importante de la teneur d'isomères *di-trans* comme le montre la figure 1.

Aussi, pour les échantillons contenant des acides gras conjugués, les méthodes qui utilisent un catalyseur basique sont recommandées. Carreau et Dubacq [11] utilisent le méthanolate de sodium à température ambiante pour méthyler les lipides complexes. Néanmoins, cette technique ne peut pas être utilisée pour méthyler les acides gras libres conjugués. La méthylation s'effectue alors à température ambiante en présence de BF₃-méthanol pendant 10 minutes

[12]. Il est également possible d'utiliser le diazométhane [13].

Pour les échantillons ne contenant pas d'acides gras conjugués, la méthode la plus couramment utilisée est la transestérification à chaud en présence de BF₃-méthanol selon la méthode décrite par Morrison et Smith [14]. L'utilisation d'une solution commerciale de BF₃-méthanol est plus simple que la préparation de solution d'HCl- ou d'H₂SO₄-méthanol au laboratoire.

La méthode généralement employée pour l'analyse de ce type d'acides gras est la chromatographie en phase gazeuse. Avec l'apparition des colonnes capillaires, l'efficacité des séparations a été nettement améliorée. L'arrivée de nouvelles phases à polarité plus élevée que le FFAP ou le Carbowax, comme les CPSil88, BPX70 ou SP2560 entre autres, a permis la séparation des isomères *cis/trans*. Ainsi, les acides oléique (*cis*-9-18:1) et élaïdique (*trans*-9-18:1) ne sont pas séparés sur une phase de type DBWax, alors qu'ils le sont avec une BPX70. Wolff et al. [15] ont pu séparer et identifier 11 isomères du 18:1 en utilisant une colonne CPSil88 de 100 m. L'analyse dure 80 minutes et permet de séparer différents isomères de position, à savoir les 6 – 8, 9, 10, 11, 12, 13 – 14, 15 et 16.

Nous obtenons des résultats semblables avec les isomères géométriques de l'acide linoléique. La séparation des isomères *cis-cis* et *trans-trans* n'est pas possible avec la DBWax, comme le montre la figure 2, alors que les 3 isomères géométriques de l'acide γ -linoléique sont séparés sur une BPX70.

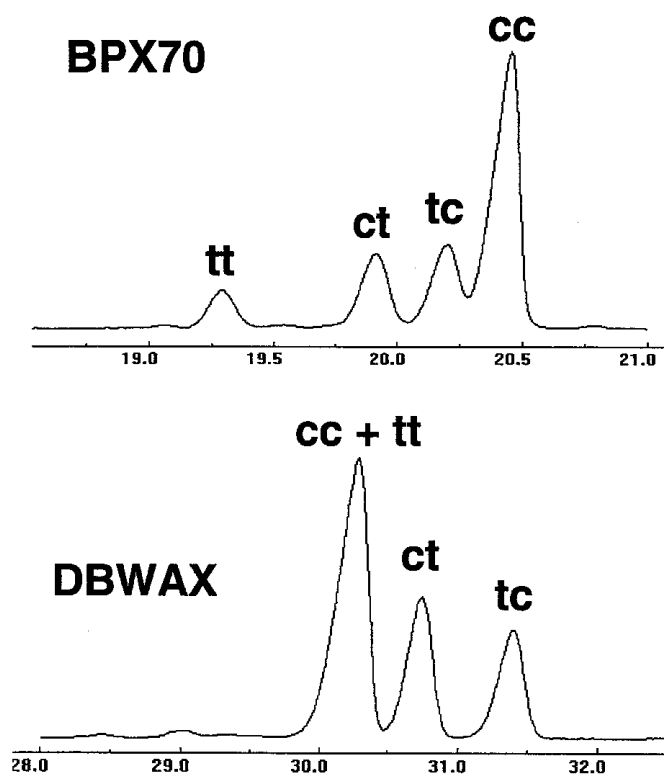


Figure 2. Chromatogramme en phase gazeuse des esters méthyliques d'isomères géométriques de l'acide linoléique sur colonne BPX70 et sur DBWAX.

Chen et al. [16] ont pu séparer et identifier de nombreux isomères *trans* d'acides gras insaturés dans des échantillons de lait humain, en utilisant une colonne SP2560 de 100 m. Environ 65 esters méthyliques d'acides gras ont été séparés en 70 minutes, dont une quinzaine d'isomères géométriques et de position du 18:1. Les auteurs ont mis en évidence la présence d'isomères du 18:2, en particulier le *cis*-9, *trans*-13-18:2, ainsi que des acides gras conjugués du 18:2, dont les temps de rétention sont proches des C20:0 et C20:1.

Le cas des isomères géométriques de l'acide γ -linoléique est plus complexe. L'isomérisation de cet acide gras peut produire 7 isomères dont un isomère *tri-trans*, 3 isomères *di-trans* et 3 isomères *mono-trans*. L'utilisation de colonnes très polaires comme la BPX70 permet de séparer 6 isomères sur les 8, comme le montre la figure 3 [17]. Une double analyse sur DBWax et BPX70 permet de quantifier l'ensemble des isomères. L'utilisation d'esters isopropyliques à la place des esters méthyliques peut être une solution annexe [18].

La chromatographie en phase gazeuse ne permet pas de résoudre tous les problèmes posés, aussi la chromatographie en phase liquide peut être, soit une alternative intéressante, soit une technique complémentaire. En effet, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide haute performance permettent de fractionner les esters méthyliques d'acides gras qui pourront être analysés ultérieurement par chromatographie en phase gazeuse.

La séparation par chromatographie liquide haute performance en phase inverse permet de séparer entre eux les familles d'acides gras en fonction du nombre de carbone et de doubles liaisons selon la formule : nombre de carbone - 2 (nombre de doubles liaisons). Cette technique décrite par Avelano [19] est simple à mettre en oeuvre. Il est possible d'injecter 20 mg d'esters méthyliques sur une colonne Nucléosil C18 de 25 cm de long et de 10 mm de diamètre, ce qui permet de séparer et de collecter les échantillons pour analyse chromatographique ultérieure. Par exemple, les esters méthyliques des lipides totaux de foie de rat ayant ingéré des acides gras *trans* peuvent être séparés en 5 fractions comme le montre la figure 4.

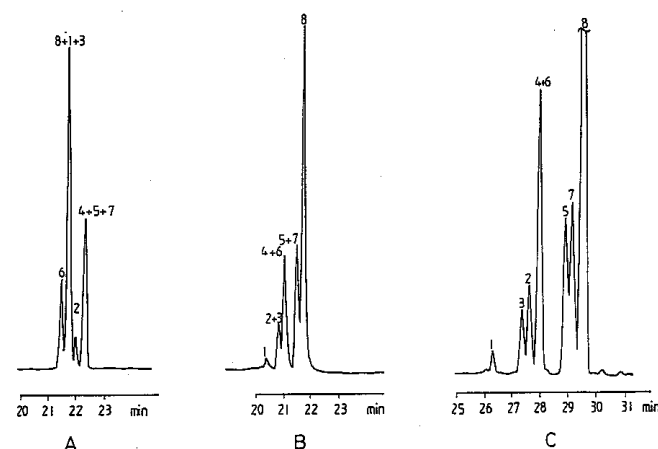


Figure 3. Chromatogramme partiel des esters méthyliques des isomères géométriques de l'acide linoléique [17] sur DBWAX (A), CPSIL84 (B) et BPX70 (C). 1. *trans*-9, *trans*-12, *trans*-15; 2. *trans*-9, *cis*-12, *trans*-15; 3. *cis*-9, *trans*-12, *trans*-15; 4. *trans*-9, *trans*-12, *cis*-15; 5. *cis*-9, *trans*-12, *cis*-15; 6. *cis*-9, *cis*-12, *trans*-15; 7. *trans*-9, *cis*-12, *cis*-15; 8. *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15.

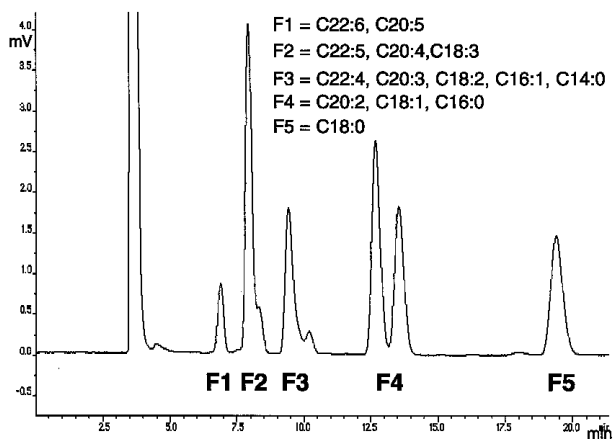


Figure 4. Fractionnement des esters méthyliques de lipides totaux de foie de rat par chromatographie liquide haute performance en phase inverse. (Colonne Nucléosil-C18, solvant : acétonitrile).

Sur ce type de phase, les isomères d'un même acide gras sont élués ensemble et les isomères du 18:1 sont parfaitement séparés de ceux du 18:2. Ainsi, alors que l'analyse en chromatographie en phase gazeuse révèle un recouvrement entre les isomères du 18:1 et du 18:2 [16], un préfractionnement de ceux-ci par chromatographie liquide haute performance comme schématisé dans la figure 4, permet de quantifier avec précision les 2 classes d'acides gras. De même, les acides gras conjugués du 18:2 sont parfaitement séparés des C20:0 et C20:1 et peuvent ainsi être identifiés et quantifiés ultérieurement par chromatographie en phase gazeuse.

Il est également souvent nécessaire de faire appel à la chromatographie liquide haute performance ou à la chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent pour le fractionnement de mélanges complexes d'isomères géométriques d'acides gras polyinsaturés. La chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent est une technique ancienne [20] qui permet de séparer les isomères *trans* des acides gras *cis*, et de tous les récupérer sans perte [21]. La chromatographie liquide haute performance imprégnée au nitrate d'argent est une technique plus récente. Les difficultés pour stabiliser l'imprégnation ont longtemps freiné le développement de cette technique. Cependant une méthode d'imprégnation efficace sur colonne cationique (Nucleosil 5SA) a été décrite par Christie [22]. Maintenant des colonnes prêtes à l'emploi sont commercialisées. Une séparation des isomères du 18:1 a été décrite par Adlof [23] en utilisant celles-ci. De plus, les 7 isomères de l'acide γ -linoléique ont été séparés et identifiés [24] en utilisant une colonne Nucleosil 5SA imprégnée au nitrate d'argent (Fig. 5).

Utilisation de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG-SM)

Le principal problème dans l'analyse structurale des AGPI est la détermination de la position de la double liaison sur la chaîne aliphatique. L'utilisation de l'impact électronique

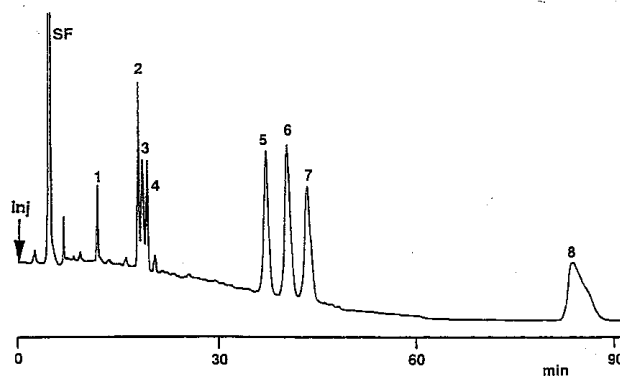


Figure 5. Séparation des dérivés phénacyles des isomères géométriques du 18:3 par chromatographie liquide haute performance imprégnée au nitrate d'argent (24). 1. *trans*-9, *trans*-12, *trans*-15; 2. *trans*-9, *cis*-12, *trans*-15; 3. *cis*-9, *trans*-12, *trans*-15; 4. *trans*-9, *trans*-12, *cis*-15; 5. *cis*-9, *trans*-12, *cis*-15; 6. *trans*-9, *cis*-12, *cis*-15; 7. *cis*-9, *cis*-12, *trans*-15; 8. *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15.

en spectrométrie de masse sur les acides gras insaturés non dérivés ne permet pas de situer la position de chacune des doubles liaisons sur la chaîne aliphatique. En effet, le spectre de masse est dominé par des ions de faible masse produits par rupture (réarrangements de Mac Lafferty) à partir du groupement ester. Les ions qui permettent de diagnostiquer la position des doubles liaisons sont absents par le fait que les doubles liaisons ont été ionisées et ont migré le long de la chaîne aliphatique [25]. Pour remédier à ce problème, il a été nécessaire de stabiliser les doubles liaisons par une modification appropriée de la molécule originale avant de l'analyser par spectrométrie de masse (SM). Deux approches ont été faites.

La première consiste à fixer la double liaison par dérivation [26,27]. Cependant ces méthodes ne sont utilisées que pour les acides gras monoinsaturés car elles ont une valeur limitée pour les acides gras polyinsaturés. La seconde approche qui est certainement la plus utilisée pour les acides gras polyinsaturés, consiste à dériver le groupement carboxylique en un composé contenant une fonction azotée, ce qui permet de minimiser l'ionisation des doubles liaisons et leur migration le long de la chaîne aliphatique. Les dérivés pyrrolidiques ont été les premiers dérivés azotés préparés, suivis ensuite des dérivés 2-alkylbenzoxazole et des dérivés triazolopyridines [26,28,29]. Néanmoins, les dérivés les plus utilisés aujourd'hui dans l'analyse des acides gras *trans* et des acides gras conjugués, sont les esters picoliniques (3-hydroxy-méthyl pyridinyl) et les dérivés 4,4-diméthylloxazolines (DMOX) [30]. À l'inverse des esters méthyliques, ces composés se fragmentent par simple rupture radicalaire le long de la chaîne aliphatique d'où une diminution du taux des ions moléculaires de faible masse et une augmentation des ions correspondant à la rupture de chaque liaison C-C [31] séparés par des intervalles de 14 unités de masse sur le spectre de masse. Ces intervalles réguliers de 14 unités de masse sont interrompus par les fragments provenant des doubles liaisons C=C.

Les esters picoliniques ont permis l'identification de certains acides gras insaturés *trans* [32]. Dans le spectre de masse obtenu d'esters picoliniques d'AGPI *trans*, comme par exemple le *cis*-9, *trans*-13-18:2 (Fig. 6), les ions m/z 91, 92, 108, 151 et 164 sont caractéristiques des esters

picoliniques [33] et l'ion moléculaire apparaît à m/z 371. Les doubles liaisons sont localisées par des intervalles de 26 unités de masse au lieu de 14 unités de masse, ce qui correspond au fractionnement des liaisons C-C de chaque côté de la double liaison [30,33]. Ainsi, l'intervalle de 26 unités de masse entre les fragments de masse m/z 314 et 288 est dû à la présence d'une double liaison en position C13 sur la chaîne aliphatique alors que les fragments de masse m/z 260 et 234 permettent de situer la seconde double liaison en position C9 de la chaîne. L'interprétation des spectres de masse des dérivés d'acides gras possédant trois doubles liaisons ou plus, est souvent difficile [30]. Aussi, pour l'identification des métabolites supérieurs à longue chaîne des isomères *trans* de l'acide linoléique ou de l'acide linoléique, les dérivés DMOX semblent donner des spectres plus facilement interprétables.

De même, pour ce qui est de l'analyse des acides gras conjugués, les esters picoliniques ont été très peu utilisés car ces dérivés ne permettaient pas d'obtenir des spectres facilement interprétables [34]. Néanmoins, Sébédio et al. ont utilisé des esters picoliniques de métabolites supérieurs de CLA obtenus par élongation et désaturation de chaîne [7] après deutération des doubles liaisons pour examiner la position de celles-ci sur la chaîne carbonée. Le spectre de masse de la molécule saturée montre des ions de haute densité séparés par 14 unités de masse, résultant des coupures de chaque liaison C-C. Les intervalles de 15 unités de masse à la place de 14 indiquent un carbone lié à un deutérium au niveau de la double liaison originale. Ainsi, les auteurs ont pu identifier le 5,8,11,13 – 20:4, un isomère conjugué de l'acide arachidonique (Fig. 7).

L'utilisation des dérivés DMOX donnent des spectres de masse qui permettent de localiser avec une grande simplicité la position de doubles liaisons sur la chaîne aliphatique des AGPI pouvant contenir jusqu'à six insaturations [35–37]. Pour cette raison, depuis quelques années, ces dérivés ont été utilisés pour l'identification de nombreux AGPI *trans* [38–40]. L'interprétation du spectre d'un dérivé DMOX d'un AGPI *trans*, comme pour leur isomère tout *cis*, est relativement simple. Prenons comme exemple le spectre du dérivé DMOX de l'acide gras *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *trans*-14-20:4 (Fig. 8) [39]. L'ion moléculaire apparaît à m/z 357. Dans ce spectre de masse, comme dans tout spectre de masse de dérivés DMOX, il n'y a pas d'ion abondant avant l'ion à m/z 113 qui correspond à un réarrangement de McLafferty [35]. De plus, nous retrouvons la série d'ions séparés par des intervalles de 14 unités de masse depuis l'ion $[M - 15]^+$ jusqu'à l'ion m/z 126 [30]. La double liaison en position C5 est localisée par le fragment abondant à m/z 153. Cet ion est caractéristique des spectres provenant de dérivés DMOX des AGPI dont la première insaturation est en position C5 [36–42]. De plus, les intervalles de 12 unités de masse à la place de 14 unités de masse entre les fragments voisins contenant $n - 1$ et n carbones indiquent qu'il y a une double liaison entre les carbones n et $n+1$ de la chaîne [37,41]. Ainsi, les doubles liaisons en position C8, C11 et C14 sont facilement localisées par les paires d'ions séparés par des intervalles de 12 unités de masse dont les masses sont respectivement m/z 180 et 192, 220 et 232, 260 et 272.

Les dérivés DMOX ont aussi été utilisés avec succès pour l'identification des isomères du CLA [43–45] ou de leurs métabolites à longue chaîne [7]. Les dérivés DMOX des acides gras conjugués donnent des spectres légèrement

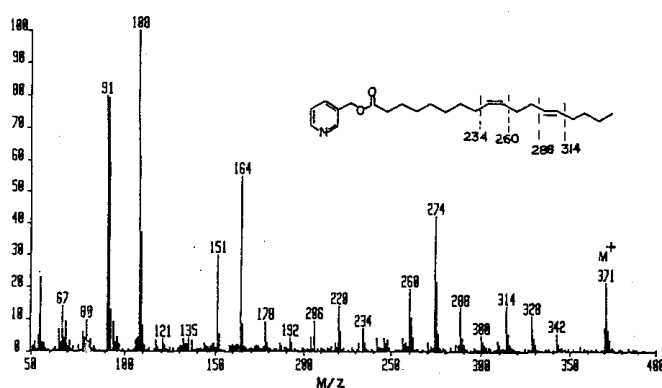


Figure 6. Spectre de masse de l'ester picolinique de l'acide *cis*-9, *trans*-13-octadecadiénoïque réalisé par Ratnayake et al. (1992) [32].

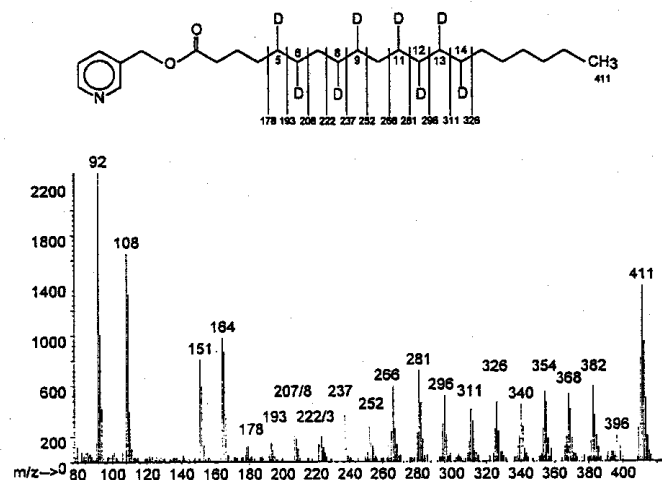


Figure 7. Spectre de masse de l'ester picolinique de l'acide 5,8,11,13-eicosatétraénoïque après deutération, réalisé par Sébédio et al. (1997) [7].

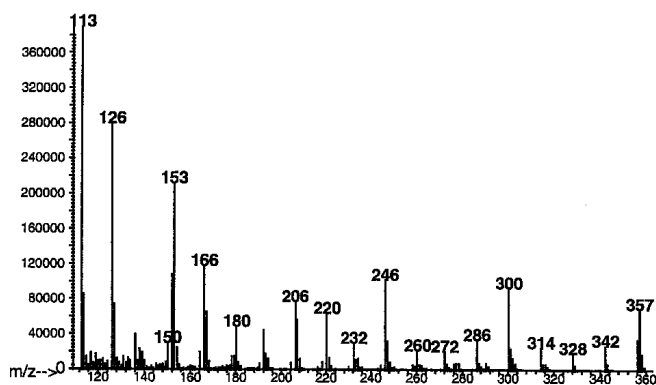


Figure 8. Spectre de masse du dérivé DMOX de l'acide *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *trans*-14-eicosatétraénoïque réalisé par Berdeaux et al. (1996) [39].

différents de ceux obtenus avec les acides gras naturels ou *trans* [44]. Par exemple, le spectre de masse du dérivé DMOX de l'acide gras *cis*-9, *trans*-11-18:2 est présenté sur la figure 9. Tout comme nous l'avons montré pour le *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *trans*-14-20:4 (Fig. 8), la série d'ions séparée par des intervalles de 14 unités de masse à partir du fragment à m/z 126 est interrompue dans la région des doubles liaisons par des intervalles de 12 unités de masse. De plus, la position du système conjugué est confirmée par deux fragments importants séparés par 80 unités de masse et résultant d'une rupture allylique des liaisons C-C qui encadrent le système conjugué (entre les carbones $n - 1$ et $n - 2$ avant la première double liaison et entre les carbones $n + 1$ et $n + 2$ après la seconde double liaison). Pour les métabolites supérieurs des CLA, comme les 8, 12, 14 - 20:3 et 5, 8, 12, 14 - 20:4 décrits par Sébédio et al. [7], on localise facilement les doubles liaisons grâce aux paires de fragments voisins séparés par 12 unités de masse au lieu de 14 pour les positions C8, C11 et C13, et par le fragment à m/z 153 pour la liaison en position C5 du 20:4. De plus, les deux ions de haute intensité séparés par 80 unités de masse qui encadrent le système conjugué, confirment cette localisation.

Enfin, un dernier type de dérivation a récemment été utilisé pour détecter et localiser les doubles liaisons conjuguées sur un ester méthylique d'acide gras. Dans cette méthode, ce sont les doubles liaisons conjuguées qui vont réagir spécifiquement avec certains diénophiles pour former des complexes par une cycloaddition de Diels-Alder. Ainsi, la 4-phényl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) [46] et la 4-méthyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (MTAD) [47] forment des complexes très stables avec les doubles liaisons conjuguées, ce qui a permis à de nombreux auteurs d'identifier certains CLA [7,45,48]. La réaction se fait sélectivement avec les doubles liaisons conjuguées, de façon instantanée à 0 °C ou à température ambiante [45-48]. Il faut cependant noter que la réaction se fait avec des rendements différents selon la géométrie des doubles liaisons conjuguées (Rendement décroissant : $tt > ct > tc > cc$) [48].

Les complexes PTAD et MTAD donnent des spectres de masse très faciles à interpréter. En effet, leurs spectres possèdent deux fragments abondants qui correspondent à la coupure (en \square du cycle) de l'une ou l'autre des deux chaînes aliphatiques adjacentes à la structure bicyclique du complexe. Ces deux fragments $[M - R]^+$ et $[M - R]^+$ permettent de localiser la position des deux doubles liaisons conjuguées [47]. Ainsi, par exemple pour le spectre du complexe MTAD avec l'ester méthylique du *cis*-9, *trans*-11 - 18:2 (Fig. 10), les deux fragments abondants à m/z 322 ($[M - 85]^+$) et m/z 250 ($[M - 157]^+$) qui correspondent aux fragmentations en \square du cycle montrent que les doubles liaisons originales se trouvaient en positions C9 et C11 de la chaîne aliphatique [45]. Le pic important à m/z 290 correspond à la perte d'une molécule de méthanol par le fragment m/z 322. Enfin, l'ion moléculaire apparaît à m/z 407.

Il faut préciser que les complexes MTAD sont préférés aux complexes PTAD pour leur plus faible volatilité en CPG (indices de Kovats plus faibles). De plus, l'analyse de ces complexes nécessite l'utilisation de colonnes capillaires non polaires, ce qui ne permet pas toujours une bonne séparation des isomères de position. Enfin, cette technique ne permet pas de déterminer la position des autres doubles liaisons non conjuguées sur la chaîne aliphatique quand l'acide gras en possède.

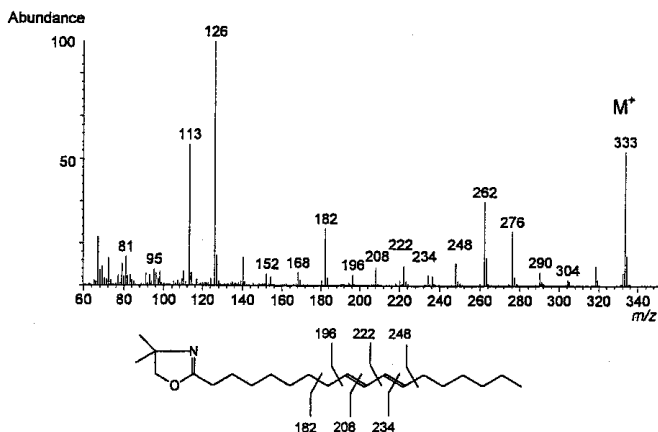


Figure 9. Spectre de masse du dérivé DMOX de l'acide *cis*-9, *trans*-11- réalisé par Berdeaux et al. (1997) [45].

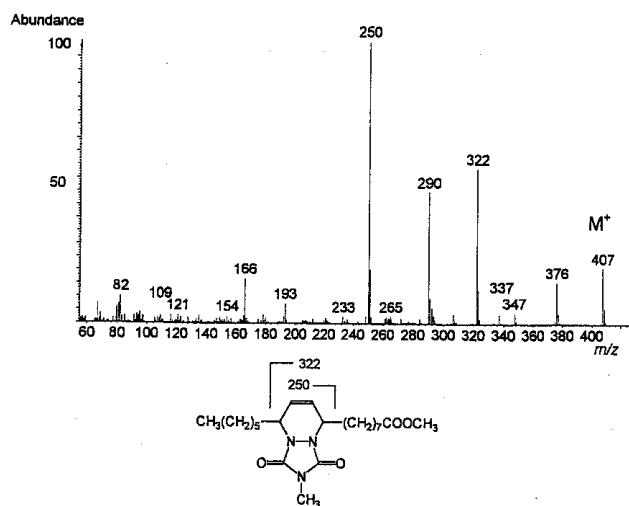


Figure 10. Spectre de masse du complexe du MTAD du *cis*-9, *trans*-11- octadécadiénoïque de méthyle réalisé par Berdeaux et al. (1997) [45].

Utilisation de la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier couplée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG-IRTF)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre infra-rouge à transformée de Fourier (CPG-IRTF) est une méthode utilisée pour la caractérisation de la géométrie des doubles liaisons. L'avantage considérable du couplage CPG-IRTF réside dans la possibilité d'obtenir des spectres infra-rouge directement sur chacun des pics d'esters méthyliques d'acides gras séparés par CPG, et cela sans préparation ni purification préalables. Le principe et l'application de cette technique aux acides gras insaturés ont été décrits dans des revues précédentes [49,50] et dans la contribution à ce dossier de J.L. Le Quéré et E. Semon. Cette technique est récente, ce qui explique que peu de travaux concernent

l'identification d'acides gras *trans* ou conjugués [39,40,43,45,50].

Quelques études ont été réalisées sur les isomères de position et géométriques d'acides gras conjugués. Ainsi, il a été constaté que les trois isomères géométriques d'un même isomère de position du CLA (comme le *cis-9, trans-11-18:2* par exemple), se distinguaient en infra-rouge par des bandes d'absorption différentes dans la région 900 – 1000 cm^{-1} : *cis-cis* négligeable (pas de bande à 730 cm^{-1}) ; *cis-trans* et *trans-cis* de 978 à 987 et de 946 à 950 cm^{-1} ; *trans-trans* de 981 à 988 cm^{-1} [43,45,50,51]. Ainsi, il est possible de faire la distinction entre un acide gras dont le système conjugué possède une seule double liaison de configuration *trans* (*ct* ou *tc*), deux doubles liaisons de configuration *trans* (*tt*) ou deux doubles liaisons de configuration *cis* (*cc*). Ceci n'est pas possible avec les diènes mono-*trans* ou di-*trans* non conjugués dont les spectres ne présentent qu'une seule bande d'absorption pour la double liaison *trans* dans la région 965 – 972 cm^{-1} .

Enfin, Wahl et al. [52] ont utilisé la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et à l'infra-rouge à transformée de Fourier (CPG-SM-IRTF) pour l'identification d'isomères *trans* d'esters méthyliques et de dérivés DMOX d'acides gras à partir de matrices complexes. Cette méthode permet d'obtenir directement le spectre IR à partir des dérivés DMOX, ce qui pourrait éviter tout risque de confusion lors de l'identification de composés dans une forêt de pics, entre d'un côté les esters méthyliques en IRTF et de l'autre les dérivés DMOX en CPG-SM. Cependant, cette technique n'a pas été testée avec les AGPI *trans* à longues chaînes, ni avec des acides gras conjugués.

Lorsque l'acide gras ne comporte qu'une liaison éthylénique, la combinaison de la CPG-SM et de la CPG-IRTF permet d'élucider totalement la structure de la molécule, à savoir le nombre de carbones, la position et la géométrie de la liaison éthylénique. Cela n'est plus possible dans le cas où l'acide gras comporte plus d'une liaison éthylénique. En effet, alors que la CPG-SM permet de localiser la position de celle-ci, la CPG-IRTF ne permet que de détecter la présence ou non de liaison(s) éthylénique(s) *trans* sans pour cela permettre de déterminer leur nombre et leur position sur la chaîne carbonée.

Il est alors nécessaire de faire appel à des techniques d'analyse plus lourdes. Dans un premier temps, l'acide gras polyinsaturé est soumis à une réduction à l'hydrazine [53]. Ainsi, par exemple, la réduction à l'hydrazine du *cis-9, trans-12 – 18:2* forme un mélange de 18:0, *cis-9 – 18:1*, *trans-12-18:1* et un peu de *cis-9, trans-12 – 18:2* qui n'a pas réagi. Cette réduction se fait sans migration ni changement de géométrie des liaisons éthyléniques. Aussi, la position et la géométrie de la liaison éthylénique dans chaque monoène représentent celles de la molécule de départ. Les monoènes sont ensuite fractionnés par chromatographie liquide haute performance et chromatographie sur couche mince imprégnée au nitrate d'argent [54] et la géométrie de chaque liaison éthylénique est déterminée par CPG-IRTF. La position de la liaison éthylénique est déterminée par CPG-SM après transformation en dérivés DMOX [41].

Références

- Dutton, H. J. in: *Geometrical and positional fatty acid isomers*, Emken, E. A. et Dutton, H. J. Eds., AOCS, Champaign, 1979; pp 1-16.
- Ackman, R. G.; Hooper, S. N.; Hooper, D. L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1974**, *51*, 42-49.
- Sébédio, J. L.; Grandgirard, A.; Prévost J. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65*, 75-81.
- Ha, Y. L.; Storkson, J.; Pariza, M. W. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 75-81.
- Sébédio, J. L.; Grandgirard, A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65*, 362-366.
- Sébédio, J. L.; Chardigny, J. M. *ISSFAL Newslett.* **1997**, *4*, 2-9.
- Sébédio, J. L.; Juanéda, P.; Dobson, G.; Ramilison, I.; Martin, J. C.; Chardigny, J. M.; Christie, W. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1345*, 5-10.
- Christie, W. W. in: *Gas chromatography and lipids*, The oily press, Ayr, Scotland, 1989; pp 64-84.
- Koritala, S.; Rohwedder, W. K. *Lipids* **1972**, *7*, 274.
- Shantha, N. C.; Decker, E. A.; Hennig, B. *J. AOAC Int.* **1993**, *76*, 644-649.
- Carreau, J. P.; Dubacq, J. P. *J. Chromatogr.* **1978**, *151*, 384-390.
- Banni, S.; Day, B. W.; Evans, R. W.; Corongiu, F. P.; Lombardi, B. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, *71*, 1321-1325.
- Schlenk, H.; Gellerman, J. L. *Anal. Chem.* **1960**, *32*, 1412-1414.
- Morrison, W. R.; Smith, L. M. *J. Lipid Res.* **1964**, *5*, 600-608.
- Wolff, R. L.; Bayard, C. C. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 1197-1201.
- Chen, Z. Y.; Pelletier, G.; Hollywood, R.; Ratnayake, W. M. N. *Lipids* **1995**, *30*, 15-21.
- Juanéda, P. in: *New trends in lipid and lipoprotein analyses*, Sébédio, J. L.; Perkins, E. G. Eds., AOCS Press, 1995; pp 75-80.
- Wolff, R. L. *J. Chromatogr. Sci.* **1992**, *30*, 17-22.
- Aveldano, M. I.; VanRollins, M.; Horrocks, L. A. *J. Lipid Res.* **1983**, *24*, 83-93.
- Morris, L. J. *J. Lipid Res.* **1966**, *7*, 717-732.
- Hill, E. E.; Husband, D. R.; Lands, W. E. M. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 4440-4451.
- Christie, W. W. *J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun* **1987**, *10*, 148-150.
- Adlof, R. O.; Copes, L. C.; Emken, E. A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 571-574.
- Juanéda, P.; Sébédio, J. L.; Christie, W. W. *J. High Resol. Chromatogr.* **1994**, *17*, 321-324.
- Spitzer, V.; Marx, F.; Maia, J. G. S.; Pfeilsticker, K. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 183-189.
- Jensen, N. J.; Gross, M. L. *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, *6*, 497.
- Minnikin, D. E. *Chem. Phys. Lipids* **1978**, *21*, 313.
- Anderson, B. A. *Prog. Chem. Fats other Lipids* **1978**, *21*, 313.
- Harvey, D. J. in: *Advances in lipid methodology one*, Christie, W. W. Ed., The Oily Press, Ayr, 1992; Ch 2.
- Dobson, G.; Christie, W. W. *Trends Anal. Chem.* **1996**, *15*, 130-137.
- Anderson, B. A.; Christie, W. W.; Holman, R. T. *Lipids* **1975**, *10*, 215-219.
- Ratnayake, W. M. N.; Pelletier, G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 95-105.
- Christie, W. W.; Brechany, E. Y.; Johnson, S. B.; Holman, R. T. *Lipids* **1986**, *21*, 657-661.
- Banni, S.; Day, B. W.; Evans, R. W.; Corongiu, F. P.; Lombardi, B. *J. Nutr. Biochem.* **1995**, *6*, 281-289.
- Yang, Y. M.; Zhang, J. Y.; Huang, Z. H. *J. Lipid Res.* **1989**, *30*, 127-133.
- Luthria, D. L.; Sprecher, H. *Lipids* **1993**, *28*, 561-564.
- Fay, L.; Richli, U. *J. Chromatogr.* **1991**, *541*, 89-98.

38. Ratnayake, W. M. N.; Chen, R. Y.; Pelletier, G.; Weber, D. *Lipids* **1994**, *22*, 707-714.
 39. Berdeaux, O.; Sébédio, J. L.; Chardigny, J. M.; Mairot, T.; Blond, J. P.; Vatèle, J. M.; Noël, J. P. *Grasas y Aceites* **1996**, *47*, 86-99.
 40. Chardigny, J. M.; Sébédio, J. L.; Grandgirard, A.; Martine, L.; Berdeaux, O.; Vatèle, J. M. *Lipids* **1996**, *31*, 165-168.
 41. Zhang, J. Y.; Yu, Q. T.; Liu, B. N.; Huang, Z. H. *Biomed. Mass. Spectrom.* **1988**, *15*, 33-44.
 42. Berdeaux, O.; Wolff, R. L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *73*, 1323-1326.
 43. Lavillonnière, F.; Martin, J. C.; Bougnoux, P.; Sébédio, J. L. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, sous presse.
 44. Spitzer, V.; Marx, F.; Pfeilsticker, K. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, *71*, 873-876.
 45. Berdeaux, O.; Christie, W. W.; Gunstone, F. D.; Sébédio, J. L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 1011-1015.
 46. Young, D. C.; Vourot, P. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1954-1957.
 47. Young, D. C.; Vourot, P. *J. Chromatogr.* **1990**, *522*, 295-302.
 48. Dobson, G. Identification of conjugated fatty acids by Gas Chromatography-mass spectrometry of 4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione adducts, submitted.
 49. Firestone, D.; Sheppard, A. in: *Advances in lipid methodology one*, Christie, W. W. Ed., The Oily Press, Ayr, 1992; Ch2.
 50. Mossoba, M. *Inform* **1993**, *4*, 854-859.
 51. Hopkins, C. Y. In: *Topics in Lipid Chemistry*, Gunstone, de F. D., Elek Books, London, Vol. 3, 1972; pp 37-85.
 52. Wahl, G. H.; Habel, S. Y.; Schmieder, N.; Liebich, H. M. *J. High Resol. Chromatogr.* **1994**, *17*, 543-548.
 53. Sébédio, J. L.; Ackman, R. G. *Lipids* **1981**, *16*, 461-467.
 54. Sébédio, J. L.; Farquharson, T. E.; Ackman, R. G. *Lipids* **1982**, *17*, 469-475.
-